

Het waarom en hoe van DuRPh: Duurzame Resistentie tegen *Phytophthora* in aardappel door cisgene merkervrije modificatie

Anton J. Haverkort, Piet Boonekamp, Evert Jacobsen, Bert Lotz en Richard Visser

Wageningen UR, Plant Sciences Group; e-mail: anton.haverkort@wur.nl

ARTIKEL

Begin 2005 verzocht de interdepartementale Commissie Biotechnologie Wageningen UR een onderzoekprogramma op te stellen voor een perspectiefvol GMO-project. Dit met het oog op de Nederlandse innovatieagenda en behoud of vergroting van de concurrentiekracht van de Nederlandse economie. Uitgangspunt daarbij was de Integrale Nota Biotechnologie (2000) met als centraal motto het verantwoord en zorgvuldig benutten van kansen ten behoeve van economie en duurzame landbouw. De keuze viel op een 'proof of principle' project van een duurzaam *Phytophthora*-resistente aardappel vanwege de economische aspecten zoals de kosten van beheersing van de ziekte en het veiligstellen van de winstgevendheid van de pootgoedsector. Milieuaspecten zoals reductie van de emissie van chemicaliën en een verminderd energiegebruik voor de toediening telden eveneens mee alsook het vergroten van de wetenschappelijke innovatiekracht. Door het bundelen van resultaten behaald binnen het Parapluplan (Bedrijfsleven en Ministerie van LNV), het center of excellence Centre for biosystems genomics (CBSG) en langjarig onderzoek van de leerstoel Plantenveredeling kon Wageningen-UR een vliegende start maken, was de gedachte.

Het project is in 2006 toegekend, duurt tien jaar en is gefinancierd met FES-gelden: aardgasbaten gestort in het Fonds voor Economische Structuurversterking. Hieronder volgen de economische en milieutechnische redenen waarom het Centraal Planbureau het project goedkeurde en lichten we de inhoud van het programma, luisterend naar de naam DuRPh (Duurzame Resistentie tegen *Phytophthora*) toe.

Kosten van de aardappelziekte

Opbrengsten

In ronde getallen gebaseerd op cijfers van de Nederlandse Aardappelorganisatie (NAO jaarverslag 2006), de FAO (www.faostat), het CBS en KWIN (Kwantitatieve Informatie van PPO-AGV van 2006) kunnen we

berekenen welke economische impact de aardappelziekte (verliezen en bestrijding) heeft en wat de economische voordelen zijn van een aardappel die geen last heeft van de aardappelziekte. Tabel 1 geeft de arealen, hectareopbrengsten en nationale productie weer, evenals de gemiddelde prijs die telers voor hun producten ontvangen.

Nederlandse aardappelen worden geteeld door 2200 pootgoedtelers, zeventuizend consumptietelers en 2500 zetmeeltelers. De rest van de aardappelsector voegt daarnaast waarde toe door 54 export- en veredelingsbedrijven, door de grote verwerkende bedrijven voor de verwerking van 3,2 Mt aardappelen voor de productie van frites, chips en koelverse producten en door de zetmeelproducten van AVEBE. De totale consumentenwaarde van de verse en verwerkte producten en uitgangsmateriaal komt zo op meer dan drie miljard euro per jaar.

Beheersing

De beheersing van *Phytophthora* met fungiciden kent de kosten van de middelen en van de toediening. *Phytophthora*-bestrijdingsmiddelen zijn voornamelijk contactmiddelen (bijvoorbeeld het mangaan- en zinkbevattende mancozeb) of middelen met een lokaal systemische werking in de plant. De kosten per middel variëren van € 11 tot € 68 per kg. In de praktijk wisselen telers middelen af om resistentieontwikkeling te voorkomen. Het gemiddelde aantal bespuitingen varieert van tien (pootgoed) tot zestien (consumptieteelt) per teeltseizoen. De kosten van de

Tabel 1. Teelt en opbrengsten van de Nederlandse aardappel (NAO en KWIN, 2006).

Aardappel	Areaal (ha)	Opbrengst (t/ha)	Productie (Mt)	Prijs (€/t)	Waarde (M€)
Consumptie	70 000	50	3,50	100	350
Pootgoed	36 000	38	1,37	200	274
Zetmeel	50 000	43	2,15	50	108
Totaal	156 000	45 (gemiddeld)	7,02		732

middelen en toediening samen komen daarmee gemiddeld op € 700 per hectare waarmee de kosten per 156 000 ha op M€ 109 uitkomen.

Biologische aardappelteelers moeten bij gebrek aan andere beheersmaatregelen op 1400 ha een loofbrander inzetten zodra de ziekte zich voordoet en de HPA-norm overschrijdt. Kosten per ha: € 112 voor 200 liter gas en € 250 voor toediening. Totale kosten nationaal zijn M€ 0.51 per jaar voor loofvernietiging in de biologische teelt.

Verliezen

Een team van vier aardappel-onderzoekers van PPO-AGV schatte dat opbrengstverlaging (volume en kwaliteit) door knolaantasting, ondanks de reguliere bestrijding, zich 1 keer in de 5 jaar op 10 % van het areaal met gemiddeld 5 % verlies voordoet. Deze 5 % zal zich door de noodzaak van vervroegde afzet en door kwaliteitskorting al snel vertalen in 20 % financieel verlies. Alleen al voor 70 000 ha consumptie-aardappel met een waarde van M€ 350 komt dit uit op M€ 1.4

In percelen met spuitsporen bleek dat de afleverbare opbrengst ca 3 % lager is dan percelen bespoten met het vliegtuig (dat mocht 25 jaar geleden nog). Een derde van de schade (dus 1%) bij consumptie- en zetmeelteelt valt toe te schrijven aan Phytophthorabeheersing. Uit Tabel 1 volgt een waarde van M€ 458 van deze teelten (350 + 108) waarvan 1 % M€ 4.58 is.

De biologische aardappelteelt (gegevens CBS) beslaat 350 ha pootgoed en 1050 ha consumptie met op kleigrond (KWIN) respectievelijk 27 en 29 t/ha opbrengst terwijl gangbare teelten 38 en 50 t/ha halen. In totaal leveren 1400 ha biologische aardappelen 25900 t minder aardappel op dan de gangbare tegenhanger. Als we de helft van dit verlies toeschrijven aan Phytophthora doordat geen chemische beheersing is ingezet en het loof voortijdig is vernietigd, is de schade door Phytophthora in de biologische aardappelteelt 12950 t x € 250 per t = M€ 3.24

De totale schade door het eerder doden van het gewas (M€ 1.4) en schade door spuitsporen (M€ 5.58) en opbrengstderving in de biologische teelt (M€ 3.24) komt daarmee op M€ 10.22 waarmee we de totale schade door Phytophthora in Nederland schatten op 120 miljoen Euro per jaar ofwel meer dan 15 % van wat de telers ontvangen voor hun product. Als we dit doortrekken naar de hele wereld met 19 miljoen hectare en 320 miljoen ton opbrengst zijn de kosten van Phytophthorabeheersing inclusief verliezen mondiaal ongeveer 10 miljard € per jaar.

Milieu

Energetisch bekeken kost een volledige teeltcyclus van de aardappel op basis van getallen in KWIN circa 25 GJ per hectare. Toediening van 15 kg middel tegen Phytophthora kost aan energie voor het middel 40 MJ per kg dus 600

MJ per hectare. Vijftien keer spuiten kost 15 x 2 liter diesel = 30 L x 55 MJ per liter (inclusief indirecte energie voor machines en dergelijke) = 1650 MJ. Phytophthorabeheersing kost aan energie dus 0,6 + 1.65 GJ = 2.25 GJ per jaar ofwel 9 % van de totale benodigde energie voor de teelt.

Andere milieukosten zijn uit te drukken in de vorm van de milieubelastingpunten berekend door het Centrum voor Landbouw en Milieu (CLM) voor grondwater, waterleven en lucht. De milieubelasting van fungiciden is sterk afhankelijk van het gebruikte middel en treft met name het waterleven, maar is tegelijkertijd beduidend lager dan de milieubelasting van herbiciden en insecticiden. De effecten op de mens zijn ook veel geringer dan die van herbiciden en insecticiden volgens de 'Veiligheidsinformatiebladen' overeenkomstig EG-richtlijnen. De actieve stoffen van fungiciden kunnen schadelijk zijn (geven bijvoorbeeld irritatie) doch weinig toxisch met orale LD₅₀'s in het bereik van 2000 tot 5000 mg/kg. Insecticiden bijvoorbeeld zijn veel meer toxisch met LD₅₀'s kleiner dan 100 mg/kg.

Aanpak in DuRPh

Naast de aandacht voor de bovenbeschreven maatschappelijke impact hanteert DuRPh twee principes die van invloed kunnen zijn op maatschappelijke acceptatie van genetische modificatie van de aardappel, namelijk cisgeen en merkervrij:

- Cisgeen: de modificaties doen we uitsluitend met (wilde) aardappel-eigen genen, dus genen uit de wilde soort die ook via klassieke veredelingsstechnieken kruisbaar is met *Solanum*

tuberosum. Cisgene veredeling is mogelijk omdat wilde verwanten van *S. tuberosum* majeure genen hebben tegen Phytophthora en dat het resultaat een weliswaar gemodificeerde aardappel is maar slechts aardappelgenen bevat. Dit in tegenstelling tot transgene gewassen die genen uit niet verwante soorten bevatten. Indien regelgeving en publieke reactie dit oppakken zou acceptatie wel eens snel kunnen verlopen.

- Merkervrij: de gemodificeerde aardappel is vrij van merkers zoals antibioticum- of herbicideresistentie.

In dit programma gaat het om het aantonen van een “*Proof of Principle*”; niet om het genereren en exploiteren van commerciële rassen. De uitkomsten publiceren we zodat iedereen de vorderingen kan volgen en het bedrijfsleven er direct van kan profiteren. Het programma bestaat uit vijf projecten: klonering, transformatie, selectie, resistentie management en communicatie.

Klonering

In 2006 zijn in verschillende projecten vier R-genen (resistentiegenen) gekloneerd. In de loop van 2007 komen er nog 3 R-genen bij en in de loop van het programma komen er nog 4-6 bij uit verschillende wilde aardappelsoorten. Met deze 11-13 R-genen maken we cassettes met verschillende combinaties van R-genen die we bij het volgende onderdeel overbrengen naar bestaande rassen.

Om de aanvullende set R-genen te kloneren doorlopen we de volgende stappen:

- het maken van segregerende populaties
- bepaling van het resistentiespectrum
- ontwikkelen en identificeren

van moleculaire merkers

- opknippen van het genoom en bewaren in *E. coli* (BAC-bank)
- identificeren van de basenvolgorde van DNA-stukjes die vermoedelijk coderen voor R-genen
- overdragen van kandidaatgenen naar de natuurlijke plantvector *Agrobacterium tumefaciens*

Transformatie

Hier transformeren we een set aardappelrassen door ze te voorzien van R-gencassettes met verschillende aantallen genen en combinaties van genen. Deze rassen gebruiken we in het onderdeel resistentie management om het effect van R-genstapelings en mengrassen op de epidemiologie van Phytophthora-uitbraken in het veld te toetsen.

- analyseren van rassen die het meest geschikt zijn om te transformeren
- ontwikkeling van mono- en Multi-R-gencassettes met verschillende sets van R-genen
- transformeren ervan met *A. tumefaciens* als vector naar 3 rassen
- regenereren van vijftig primaire transformanten per transformatie (via callus)
- functionele, fenotypische en moleculaire analyse van deze transformanten

Selectie

Het doel van de selectie is vast te stellen of de genen tot expressie komen en getransformeerde planten (types) te selecteren die uiterlijk niet afwijken van het wildtype. Een afwijkende morfologie is in de eerste plaats ongewenst omdat de morfologie (uiterlijke verschijningsvorm) invloed heeft op de resistentie tegen Phytophthora doordat de architectuur kan leiden tot bijvoorbeeld een

langere bladnatperiode en in de tweede plaats is het van belang voor het resistentie management. Als de transformant niet van het wildtype is te onderscheiden biedt het de mogelijkheid om:

- in de loop van de tijd weer andere setjes genen in te brengen om de kans op doorbreken van de resistentie te verminderen
- binnen één veld een mengsel van dit ras te telen waarin verschillende sets R-genen zitten

Het uiteindelijke doel is om “flexibele rassen” te maken die om de zoveel tijd een nieuwe set genen krijgen om zodoende Phytophthora steeds voor te blijven.

Resistentie management

Het doel van dit onderdeel is ervoor te zorgen dat *P. infestans* de resistentie die in bestaande rassen wordt ingebouwd niet meer (snel) doorbreekt zoals dat in het verleden wel is gebeurd. In een mix van veldexperimenten en computersimulatiestudies zoeken we naar de manier waarop de verschillende sets R-genen het meest effectief kunnen worden ingezet in ruimte en tijd. Hierbij worden allerlei variabelen meegewogen zoals de afstanden tussen de aardappelakkers, de grootte ervan, vroegheid van het ras, het weer en de beheersingsstrategie van de ziekte waaronder mengsels van (flexibele) rassen binnen velden en tussen velden. De meest effectieve opties werken we uit om te toetsen in meerjarige veldproeven.

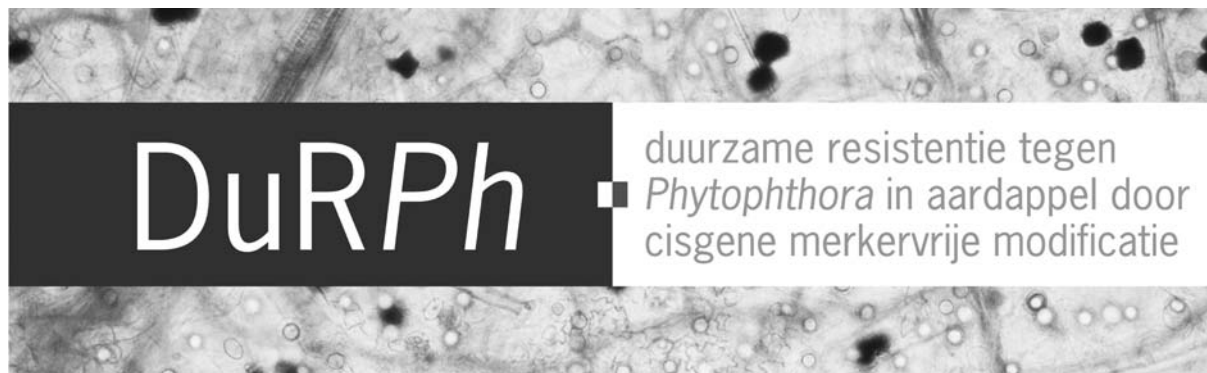
Daarnaast volgen we jaarlijks het virulentiespectrum van *P. infestans* om vast te stellen of zich wijzigingen voordoen waar de resistentiestrategie gevolg aan moet geven.

Communicatie

Het doel van dit onderwerp binnen het programma is alle belanghebbenden en belangstellenden van meet af aan te

betrekken door middel van communicatie en interactie. Daarvoor verstrekken we alle informatie over de voor- en nadelen van de ontwikkeling van een

cisgene merkervrije Phytothoraresistente aardappel zodat iedereen zich een mening over deze innovatie kan vormen. Zie ook www.DuRPh.nl.



[ARTIKEL

Vooraankondiging

KNPV-najaarsvergadering in samenwerking met COGEM

*Discussiemiddag over GMO's
november 2007*

Info: www.knpv.org